

· 论著 ·

新型吡嗪酮衍生物的合成及其对血小板聚集的抑制作用

宋 琰, 仓 捷, 孟 蕾, 马福家 (解放军455医院药剂科, 上海 200052)

[摘要] 目的 合成新的含有胺基的吡嗪酮类化合物,并研究其对此类化合物抗血小板聚集活性的影响。方法 设计合成未见报道的目标化合物9个,所有化合物均经过¹H-NMR谱等确证;参考文献方法进行体外药理实验。结果 发现所有化合物都具有抗血小板凝集的活性,其中化合物9c,9e和9i的抗血小板凝集活性明显优于对照化合物MCI-154和CCI-17910。结论 引入不同的取代胺基,对化合物抑制血小板聚集的活性有影响。

[关键词] 化学合成;吡嗪酮类;体外抗血小板聚集

[中图分类号] R973,R914.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2014)02-0107-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.02.008

Synthesis and platelet aggregation inhibition activity of new derivatives of pyridazinone

SONG Yan, CANG Jie, MENG Lei, MA Fujia (No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

[Abstract] **Objective** To study the antiplatelet aggregative activity of 6-(4-substitued acetamino-phenyl 4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinones with different amino group. **Methods** Nine target compounds were designed and synthesized. All of them were confirmed by ¹H-NMR spectra. Born method was applied for preliminary pharmacological test *in vitro*. **Results** All of the target compounds were not reported. The results of preliminary pharmacological test showed that all the target compounds exhibited potent antiplatelet aggregative activity to a certain extent. Compounds 9c, 9e and 9i were better than MCI-154 and CCI-17910 *in vitro*. **Conclusion** Inletting different substituted amino groups could enhance the antiplatelet aggregation activity of the compounds.

[Key words] chemical synthesis; pyridazines; platelet aggregation

血小板聚集在血栓形成中起着关键的作用,严重威胁人类生命健康的心脑血管疾病多数与血栓形成和血栓栓塞有关^[1]。二氢吡嗪酮类化合物对抑制血小板聚集有较强的药理活性,对二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)、血小板活化因子(PAF)和胶原引起的血小板聚集均有抑制作用^[2,3]。深入研究二氢吡嗪酮类化合物的构效关系,寻找高效低毒的药物,是开发新型心脑血管系统疾病药物的重要研究方向之一。

为进一步探讨二氢吡嗪酮类化合物的构效关系,以期寻找药理活性更强的血小板聚集抑制剂,本课题设计合成了9个6-(4-取代苯甲酰氨基苯基)-5-甲基-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮类衍生物。参考文献方法[2-4]以乙酰苯胺为原料经付克酰化反应、氰化、水解、水合肼环化反应得6-(4-氨基苯基)-5-甲基-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮,将其与不同酰卤反应得目标化合物8,化合物8再与不同的仲胺反应得到目标化合物9a~9i,并测定了其体外由ADP诱导

的人血小板聚集的抑制。

1 化合物设计

由6-(4-取代苯基)-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮类化合物的作用机制及其构效关系可知^[4,5]:二氢吡嗪酮环中酰胺氮上的氢必须处于游离状态,烷基取代后活性降低或消失;二氢吡嗪酮环6位取代苯基的对位可以为吸电子基,也可以为供电子基,但必须处于对位。本研究以CCI-17810和MCI-154为先导化合物(图1),保留了此类化合物中抗血小板聚集药理活性的基本结构二氢吡嗪酮,同时保持了二氢吡嗪酮环中酰胺氮上的氢必须处于游离状态。通过对R基团的结构改造,设计并合成了9个化合物,以期寻找具有较强抗血小板凝集活性的吡嗪酮类衍生物。其合成路线见图2。

2 实验部分

柳本显微熔点测定仪,温度未经校正;元素分析用Elementa Varoo ELIII测定;红外光谱用Shimadzu型红外光谱仪测定;核磁图谱用Bruker AC-300D型核

[作者简介] 宋 琰,女,医学博士。E-mail:songyan455@gmail.com.

[通讯作者] 马福加,副主任药师。E-mail:fjma455@gmail.com.

磁共振仪测定, DMSO-d₆ 为溶剂, TMS 为内标; G 薄层析(TLC)用硅胶 H (10 ~ 40 μm); PAM2-PPP 型自动平衡血小板聚集仪。新西兰大白兔(δ)。ADP(美

国 Sigma 公司); MCI-154, CCI-17810 为 6-[4-(4 苯乙酰基)哌嗪基]苯基]-5-甲基-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮, 由第二军医大学药学院有机化学教研室合成。

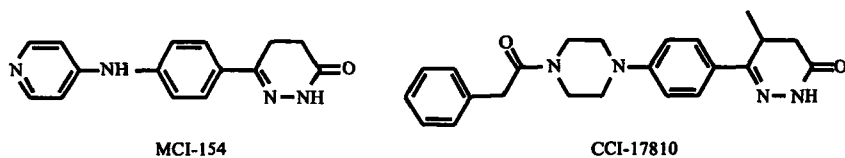


图1 MCI-154 和 CCI-17810 的结构

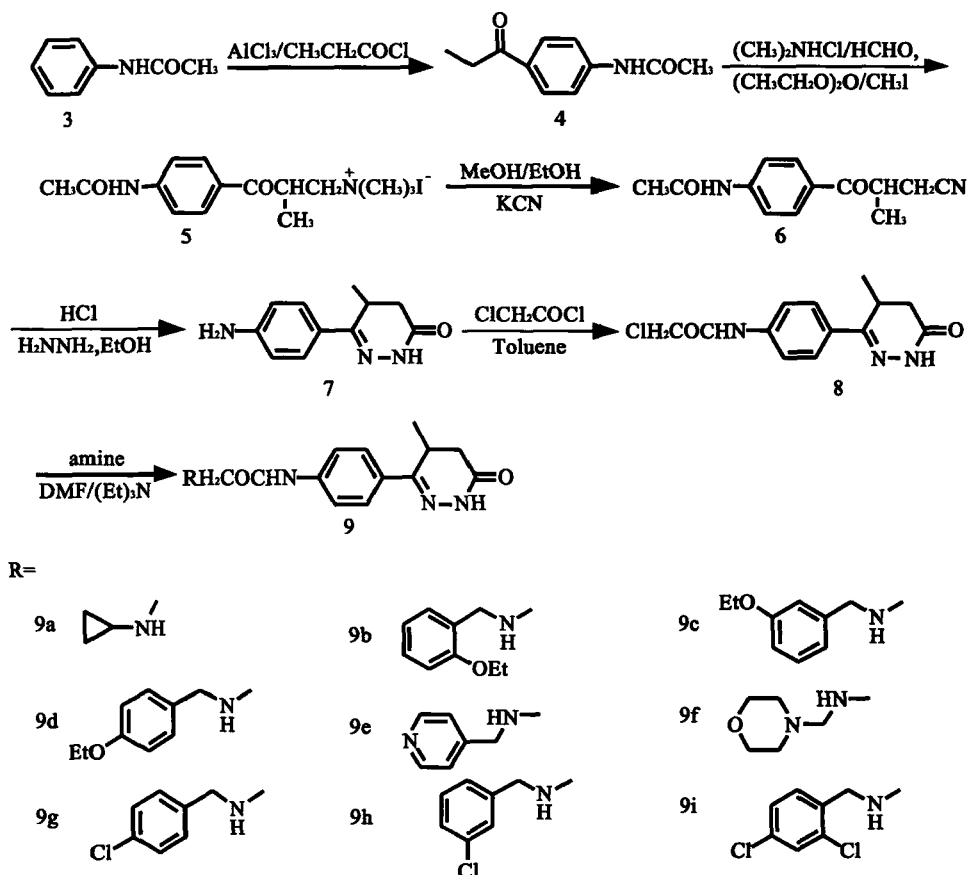


图2 6-(4-取代乙酰氨基苯基)-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮的合成路线

2.1 6-[4-(氯乙酰氨基)苯基]-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮的制备

2.1.1 6-(4-氨基苯基)-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮的制备 参考王曙东等^[2]研究方法由乙酰苯胺合成, mp 194 ~ 195 °C, 产率 61.3% (王曙东等^[4]研究表明, mp 194 ~ 195 °C, 收率 58.2%)。

2.1.2 6-[4-(氯乙酰氨基)苯基]-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮的制备 6-(4-氨基苯基)-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮 1.00 g (5.29 mmol), 加入 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 15 ml 和三乙胺 0.74 ml, 于 0 ~ 5 °C 缓慢滴加氯乙酰氯 0.43 ml (5.30 mmol) 和 N, N-二甲基甲酰胺

(DMF) 2 ml 的混合液, 加毕, 室温搅拌 5 h, TLC (展开剂氯仿: 甲醇 = 20:1) 跟踪反应, 反应完毕加适量水, 有沉淀析出, 过滤, 水洗数次, 用无水乙醇重结晶, 干燥得 1.09 g, mp 232 ~ 235 °C, 收率 77.6% (文献 [6] 报道, mp 233 °C, 收率 70.1%)。

2.2 6-[4-(环丙基乙酰氨基)苯基]-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮(9a)的制备 6-[4-(氯乙酰氨基)苯基]-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮 0.20 g (0.7 mmol) 加入 8 ml DMF 中, 室温条件下滴加环丙胺 0.10 ml (0.9 mmol), 反应 4 h, TLC (展开剂氯仿: 甲醇 = 20:1) 跟踪, 反应毕, 将反应液倾入水中, 放置 3 ~

4 h, 过滤得化合物 9a 0.18 g, 收率 84.2%。合成 9 个化合物的理化和波谱数据详见表 1。

表 1 目标化合物的理化和波谱数据

化合物	mp(°C)	得率(%)	MS(ESI)	IR(KBr), ν_{\max} (cm^{-1})	$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, TMS) δ
9a	161 ~ 163	87%	300.1(M + H) ⁺	3 335, 3 240, 1 701 1 596, 837	0.30 (2H, m, CH ₂), 0.38 (2H, m, CH ₂), 1.04 ~ 1.06 (d, 3H, J = 4.5, CH ₃); 2.18 (1H, m, CH); 2.43 (1H, m, CH); 3.12 (2H, s, CH ₂ C = O), 3.26 (2H, s, NCH ₂ C = O); 7.66 ~ 7.71 (4H, dd, J = 8.0, Ph-H); 9.82 (1H, s, CO NH), 10.76 (1H, s, CONH)
9b	195 ~ 197	88%	349.2(M + H) ⁺	3 341, 3 210, 1 729 1 580, 848	1.03 ~ 1.06 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 1.29 (3H, t, CH ₃); 2.43 (1H, m, CH); 2.42 (2H, s, NCH ₂); 2.91 (2H, t, CH ₂ CO); 3.30 (2H, s, CH ₂ C = O); 4.00 (2H, t, OCH ₂); 6.83 ~ 6.92 (2H, m, PhH); 7.64 ~ 7.74 (4H, dd, J = 8.0, Ph-H); 9.88 (1H, s, CONH), 10.89 (s, 1H, CONH)
9c	201 ~ 203	90%	349.2(M + H) ⁺	3 340, 3 240, 1 730 1 600, 848	1.03 ~ 1.06 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 1.29 (3H, t, CH ₃); 2.43 (1H, m, CH); 2.42 (2H, s, NCH ₂); 2.91 (2H, t, CH ₂ CO); 3.30 (2H, s, CH ₂ C = O); 4.00 (2H, t, OCH ₂); 6.83 ~ 6.92 (2H, m, PhH); 7.64 ~ 7.74 (4H, dd, J = 8.0, Ph-H); 9.88 (s, 1H, CONH), 10.89 (s, 1H, CONH)
9d	193 ~ 195	95%	349.2(M + H) ⁺	3 340, 3 230, 1 729 1 596, 848	1.03 ~ 1.06 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 1.29 (3H, t, CH ₃); 2.43 (1H, m, CH); 2.42 (2H, s, NCH ₂); 2.91 (2H, t, CH ₂ CO); 3.30 (2H, s, CH ₂ C = O); 4.00 (2H, t, OCH ₂); 6.83 ~ 6.92 (2H, m, PhH); 7.64 ~ 7.74 (4H, dd, J = 8.0, Ph-H); 9.88 (s, 1H, CONH), 10.89 (s, 1H, CONH)
9e	202 ~ 205	88%	374.2(M + Na) ⁺	3 335, 3 240, 1 701 1 596, 837	1.03 ~ 1.06 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 2.18 ~ 2.23 (m, 1H, CH); 2.77 (2H, m, NCH ₂); 2.85 (2H, t); 2.92 (2H, d, CH ₂ C = O); 3.36 (d, 2H, NCH ₂ C = O); 7.26 ~ 8.46 (4H, m, Py-H); 7.57 ~ 7.70 (4H, dd, J = 8, PhH); 9.89 (s, 1H, NH); 10.90 (s, 1H, CONH)
9f	171 ~ 172	90%	360.2(M + H) ⁺	3 339, 3 230, 1 740 1 596, 827	1.03 ~ 1.06 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 2.18 ~ 2.23 (1H, m, CH); 2.36 (4H, t, NCH ₂); 2.43 (2H, t, CH ₂); 2.66 (2H, m, NCH ₂); 2.92 (2H, s, CH ₂ C = O); 3.37 (d, 2H, CH ₂ C = O); 3.56 (4H, t, OCH ₂); 7.66 ~ 7.75 (4H, m, Ph-H); 9.89 (s, 1H, CONH); 10.76 (s, 1H, CONH)
9g	194 ~ 196	86%	385.1(M + H) ⁺	3 330, 3 249, 1 721 1 590, 837	1.03 ~ 1.06 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 2.18 ~ 2.23 (1H, m, CH); 2.72 (2H, s, NCH ₂); 3.01 (s, 2H, CH ₂ C = O); 3.34 (s, 2H, CH ₂ C = O); 7.26 ~ 7.34 (4H, m, Ph-H); 7.54 ~ 7.69 (4H, m, Ph-H); 9.79 (1H, s, CONH); 10.93 (1H, s, CONH)
9h	218 ~ 220	86%	385.1(M + H) ⁺	3 340, 3 230, 1 711 1 580, 820	1.01 ~ 1.05 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 2.19 ~ 2.23 (1H, m, CH); 2.72 (2H, s, NCH ₂); 3.01 (s, 2H, CH ₂ C = O); 3.34 (s, 2H, CH ₂ C = O); 7.26 ~ 7.34 (4H, dd, J = 8.5, Ph-H); 7.54 ~ 7.69 (4H, dd, J = 8.0, Ph-H); 9.79 (1H, s, CONH); 10.93 (1H, s, CONH)
9i	208 ~ 210	86%	419.1(M + H) ⁺	3 310, 3 240, 1 701 1 580, 837	1.01 ~ 1.05 (3H, d, J = 4.5, CH ₃); 2.19 ~ 2.23 (1H, m, CH); 2.72 (2H, s, NCH ₂); 3.01 (s, 2H, CH ₂ C = O); 3.34 (s, 2H, CH ₂ C = O); 7.36 ~ 7.44 (3H, m, J = 8.5, Ph-H); 7.54 ~ 7.69 (4H, dd, J = 8.0, Ph-H); 9.79 (1H, s, CONH); 10.90 (1H, s, CONH)

2.3 药理实验 参考 Born 比浊法^[7], 笔者以先导化合物 MCI-154, CCI-17 810 为阳性对照, 测定了所有目标化合物对 ADP 诱导的新西兰大白兔血小板聚集的 IC₅₀ 值。取新西兰大白兔心脏血, 离心制备富含血小板的血浆 (PRP) 和贫血小板的血浆 (PPP); 用 PRP

和 PPP 调整血小板聚集仪; 取 200 μl PRP 于比色管中, 加入 1 μl 二甲亚砜 (DMSO), 37°C 温孵 10 min, 搅拌 40 s 后, 分别加入不同剂量的 ADP, 搅拌下观察 5 min 内血小板的最大聚集程度, 从而摸出诱导 (下转第 123 页)

2.9 样品的测定 取安坤颗粒样品,按照供试品溶液的制备方法,进样测定,每批平行测定2份,分别按外标法计算栀子苷及芍药苷的含量,结果见表2。

表2 安坤颗粒中栀子苷和芍药苷含量(mg/g, n=3)

批号	栀子苷	芍药苷
20111017	2.34	0.82
20120205	2.42	0.79
20120305	2.37	0.81

3 讨论

3.1 优化提取方法 本实验在优化样品的前处理方法时,比较了索氏提取、加热回流提取和超声提取3种方法。结果显示,回流提取法样品液色谱中杂质干扰较多、提取时间较长,而索氏提取所得样品虽然杂质干扰少,但提取时间长,提取效率不高,唯有用超声波提取效率最高,可以在较短的时间内使得所测成分提取完全,虽有杂质,但对被测成分的检出无干扰,故而选择用超声波提取方式来对样品进行前处理。

3.2 流动相的选择 对甲醇-水-冰醋酸^[2]、甲醇-1%冰醋酸水溶液-四氢呋喃^[3]以及乙腈-1%磷酸^[4]

等系统进行了比较,结果表明,乙腈-水^[5]两者比例为14:86时,安坤颗粒中栀子苷和芍药苷的分离完全,峰形对称,其他成分不干扰。

本法测定了安坤颗粒中栀子和白芍中栀子苷和芍药苷的含量,结果准确,测定过程样品处理操作简便,仅为甲醇超声溶解,且样品取样量少,精密度与重现性较好,流动相组分简单,适用于安坤颗粒的质量控制。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂:第十九册[S]. 1998:72.
- [2] 吴毅,张文惠,王永刚. HPLC法测定安坤颗粒中芍药苷的含量[J]. 江西中医学院学报, 2002, 14(1):42.
- [3] 汤浩,封士兰,闵光涛,等. HPLC同时测定赤栀黄胶囊中栀子苷和芍药苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(5):361-364.
- [4] 李卫华. HPLC法测定丹栀逍遥丸中芍药苷的含量[J]. 海峡药学, 2001, 13(2):38.
- [5] 刘阿静,齐广才,刘珍叶,等. RP-HPLC法测定防风通圣丸中芍药苷、栀子苷、黄芩苷和连翘苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5):415-417.

[收稿日期] 2013-09-05 [修回日期] 2013-11-07
[本文编辑] 李睿旻

(上接第109页)

剂的阈剂量;再将供试品10、5、1、0.5、0.25 μmol/L的DMSO溶液,加入到含200 PRP的比色管中,37℃温孵10 min,搅拌40 s后,加入阈剂量的ADP,搅拌下观察5 min内血小板的最大聚集程度,计算血小板聚集的抑制百分率并用回归法求出IC₅₀。结果见表2。

表2 目标化合物的生物活性数据(μmol/L)

化合物	IC ₅₀	化合物	IC ₅₀
9a	0.2	9g	0.9
9b	0.5	9h	1.4
9c	0.1	9i	0.2
9d	2.0	MCI-154	2.5
9e	0.05	CCI-17810	3.3
9f	0.5		

3 讨论

所合成的9个目标化合物均未见文献报道,其结构经元素分析、红外光谱和核磁共振谱所证实,数据见表1。在以乙酰苯胺制备中间体6-(4-氨基苯基)-4,5-二氢-3(2H)吡嗪酮时,反应中间产物可不经精制,直接投入下步反应,简化了操作。在目标化合物制备过程中,把反应液直接倾入到水中,过滤即得目标化合物,避免了文献报道的柱层析等复杂的操作。初步的体外药理结果表明(表2),所有目标化合物都有不同程度的体外抑制ADP诱导的新西兰大白兔血小板聚集作用,且都强于对照化合物MCI-154和CCI-17810。其中化合物9e的活性最

强,IC₅₀为MCI-154的50倍,是CCI-17810的66倍,此外,化合物9a、9c、9i也显示了较强的活性。化合物9e等的作用机制及其他药理作用还有待进一步研究。从上面的药理活性数据来看,R基团引入取代胺基可以增强其血小板聚集的抑制作用,但由于目标化合物的数目有限,难以得出具体的构效关系的结论,有待进一步的研究。

【参考文献】

- [1] Bristol JA, Sircar L, Moos WH, et al. Cardiostonic agents 1. 4, 5-dihydro-6-[4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]-3(2H)-pyridazinones: novel positive inotropic agents for the treatment of congestive heart failure[J]. J Med Chem, 1984, 27(9): 1099.
- [2] Yang GM, Liu LM, Xu J. Effects of MIC-154 on vascular reactivity and its mechanisms after hemorrhagic shock in rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006, 47(6): 751.
- [3] Mikashima H, Nakao T, Goto K. Y-590 (a new pyridazinone derivative), a potent anti-thrombotic agent-I. Effect on platelet function[J]. Thromb Res, 1983, 31(4): 599.
- [4] 王曙东,陈兴东,赵庆杰,等. 吡嗪酮类新衍生物的合成及其对血小板聚集的抑制作用[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(5):362.
- [5] 章杰兵,柴晓云,俞世冲,等. 吡嗪酮类新衍生物的合成及其对血小板聚集的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(7):821.
- [6] 王恩思,沈家聪. 新型强心药匹莫苯的合成[J]. 中国药物化学杂志, 1997, 7(3):185.
- [7] Bom GVR. Aggregation of bloodplatelets by adenosine diphosphate and its reversal[J]. Nature, 1962, 194(4832):927.

[收稿日期] 2013-06-11 [修回日期] 2013-10-16
[本文编辑] 李春德